

Optical arrangement with spectrally selective element for use in the beam path of a light source suitable for stimulation of fluorescence, pref. a confocal laser-scanning microscope

Publication number: DE19906757 (A1)

Publication date: 1999-12-02

Inventor(s): ENGELHARDT JOHANN [DE]; ULRICH HEINRICH [DE];
BRADL JOACHIM [DE]

Applicant(s): LEICA MICROSYSTEMS [DE]

Classification:


- international: **G02B21/00; G02B21/00;** (IPC1-7): G02B21/00; G02B5/32;
G02F1/33

- European: G02B21/00M4A7U

Application number: DE19991006757 19990217

Priority number(s): DE19991006757 19990217; DE19981006867 19980219

Also published as:

 DE19906757 (B4)

Abstract of **DE 19906757 (A1)**

The arrangement has at least one spectrally selective element (4) for coupling the stimulation light from at least one light source (2) into the microscope and for stopping the stimulation light reflected and scattered at the object (10) and the stimulation wavelengths from the light passing from the object over the detection beam path (12). Stimulation light of different wavelengths can be stopped by the spectrally selective element.

.....
Data supplied from the **esp@cenet** database — Worldwide

**19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

Offenlegungsschrift
DE 199 06 757 A 1

⑤ Int. Cl.⁶:
G 02 B 21/00
G 02 B 5/32
G 02 F 1/33

21 Aktenzeichen: 199 06 757.0
 22 Anmeldetag: 17. 2. 99
 43 Offenlegungstag: 2. 12. 99

(30) Unionspriorität:
 198068670 19. 02. 98 DE

(71) Anmelder:
 Leica Microsystems Heidelberg GmbH, 69120
 Heidelberg, DE

(74) Vertreter:
 Ullrich & Naumann, 69115 Heidelberg

(72) Erfinder:
Engelhardt, Johann, Dr., 76669 Bad Schönborn, DE;
Ulrich, Heinrich, Dr., 69121 Heidelberg, DE; Bradl,
Joachim, Dr., 69198 Schriesheim, DE

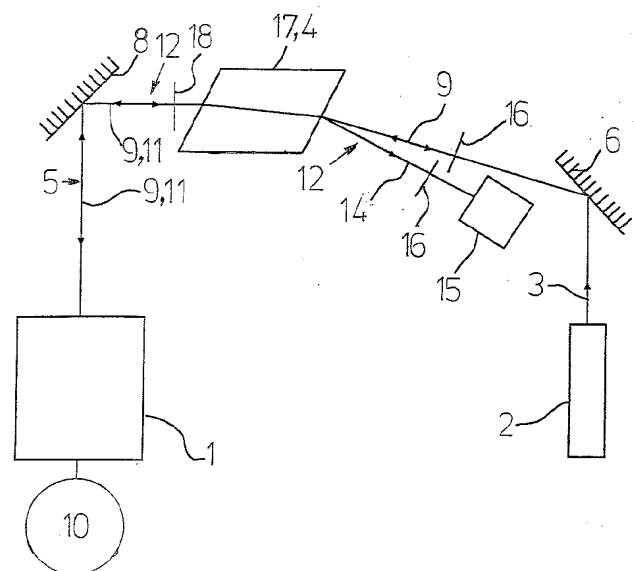
DE 199 06 757 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Optische Anordnung

(57) Eine optische Anordnung im Strahlengang einer zur Fluoreszenzanregung geeigneten Lichtquelle, vorzugsweise im Strahlengang eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops, mit mindestens einem spektral selektiven Element (4) zum Einkoppeln des Anregungslichts (3) mindestens einer Lichtquelle (2) in das Mikroskop und zum Ausblenden des am Objekt gestreuten und reflektierten Anregungslichts (3) bzw. der Anregungswellenlänge aus dem über den Detektionsstrahlengang (12) vom Objekt (10) kommenden Licht (13), ist zur variablen Ausgestaltung bei einfachster Konstruktion dadurch gekennzeichnet, daß durch das spektral selektive Element (4) Anregungslicht (3, 9) unterschiedlicher Wellenlänge ausblendbar ist. Alternativ ist eine solche optische Anordnung dadurch gekennzeichnet, daß das spektral selektive Element (4) auf die auszublendende Anregungswellenlänge einstellbar ist.



DE 199 06 757 A 1

Die Erfindung betrifft eine optische Anordnung im Strahlengang einer zur Fluoreszenzanregung geeigneten Lichtquelle, vorzugsweise im Strahlengang eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops, mit mindestens einem spektral selektiven Element zum Einkoppeln des Anregungslichts mindestens einer Lichtquelle in das Mikroskop und zum Ausblenden des am Objekt gestreuten und reflektierten Anregungslichts bzw. der Anregungswellenlänge aus dem über den Detektionsstrahlengang vom Objekt kommenden Licht.

Sowohl bei der konventionellen wie auch bei der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie werden in den Strahlengang einer für Fluoreszenzanregung geeigneten Lichtquelle Farbstrahlteiler mit einer ganz besonderen Transmissions- und Reflexionscharakteristik verwendet. Dabei handelt es sich ganz überwiegend um dichroitische Strahlteiler. Mit einem solchen Element wird die Fluoreszenzanregungswellenlänge λ_{ill1} (bzw. λ_{ill2} , λ_{ill3} , λ_{illn} bei der Verwendung von mehreren Lasern) in den Beleuchtungsstrahlengang reflektiert, um die Fluoreszenzverteilung im Objekt anzuregen und dann zusammen mit dem am Objekt gestreuten und reflektierten Anregungslicht den Strahlengang bis hin zum Farbstrahlteiler zu durchlaufen. Das Anregungslicht mit den Wellenlängen λ_{ill1} , λ_{ill2} , λ_{ill3} , \dots , λ_{illn} wird am Farbstrahlteiler zurück in den Laser reflektiert, nämlich aus dem Detektionsstrahlengang heraus. Das Fluoreszenzlicht mit den Wellenlängen λ_{fluo1} , λ_{fluo2} , λ_{fluo3} , \dots , λ_{fluon} passiert den Farbstrahlteiler und wird – gegebenenfalls nach weiterer spektraler Aufteilung – detektiert.

Farbstrahlteiler sind üblicherweise durch ein Interferenzfilter realisiert und werden je nach den verwendeten Wellenlängen für die Anregung bzw. für die Detektion gezielt bedampft. An dieser Stelle sei angemerkt, daß gemäß voranstehender Beschreibung des Standes der Technik unter einem Dichroit ein Wellenlängen-separierbares Element verstanden wird, welches das Licht unterschiedlicher Wellenlänge aufgrund der Wellenlänge und nicht aufgrund der Polarisation trennt.

In der Praxis ist die Verwendung von Farbstrahlteilern zunächst einmal insoweit nachteilig, als es sich hierbei um in der Herstellung aufwendige und daher teure optische Bausteine handelt. Des weiteren ist nachteilig, daß Farbstrahlteiler eine feste Wellenlängencharakteristik aufweisen und daher nicht mit beliebiger Flexibilität hinsichtlich der Wellenlänge des Anregungslichts verwendet werden können. Bei einem Wechsel der Wellenlänge des Anregungslichts müssen auch die Farbstrahlteiler ausgewechselt werden, so beispielsweise bei einer Anordnung mehrerer Farbstrahlteiler in einem Filterrad. Dies ist abermals aufwendig und daher teuer und erfordert im übrigen eine ganz besondere Justage der einzelnen Farbstrahlteiler.

Die Verwendung eines Farbstrahlteilers bringt den weiteren Nachteil mit sich, daß durch Reflexion bedingte Lichtverluste auftreten, insbesondere Lichtverluste von Fluoreszenzlicht, welches gerade detektiert werden soll. Der spektrale Transmissions-/Reflexionsbereich ist bei Farbstrahlteilern recht breit ($\lambda_{ill} \pm 20$ nm) und keineswegs ideal "steil". Folglich läßt sich das Fluoreszenzlicht aus diesem spektralen Bereich nicht ideal detektieren.

Bei Verwendung von Farbstrahlteilern ist die Anzahl der gleichzeitig einkoppelbaren Laser begrenzt, nämlich beispielsweise auf die Anzahl der in einem Filterrad angeordneten und kombinierbaren Farbstrahlteiler. Üblicherweise werden maximal drei Laser in den Strahlengang eingekoppelt. Wie bereits zuvor ausgeführt, müssen sämtliche Farbstrahlteiler, also auch die in einem Filterrad angeordneten Farbstrahlteiler, exakt justiert werden, was einen ganz er-

heblichen Aufwand in der Handhabung mit sich bringt. Alternativ können geeignete Neutralstrahlteiler eingesetzt werden, die das Fluoreszenzlicht gemeinsam mit dem am Objekt gestreuten/reflektierten Anregungslicht effizient zum Detektor leiten. Die Verluste bei der Lasereinkopplung sind dabei jedoch erheblich.

Zur Dokumentation des Standes der Technik wird lediglich beispielhaft auf die DE 196 27 568 A1 verwiesen, die eine optische Anordnung zur konfokalen Mikroskopie zeigt. Dabei handelt es sich im Konkreten um eine Anordnung zur zeitgleichen konfokalen Beleuchtung einer Objektebene mit einer Vielzahl geeignet divergierender Leuchtpunkte sowie zugehörigen Abbildungsgliedern und einer Vielzahl von Pinholes zur konfokalen kontrastreichen Abbildung in einem Beobachtungsgerät, wobei es sich dabei um ein Mikroskop handeln kann. Die Einkopplung mehrerer Lichtquellen erfolgt dort über ein diffraktives Element. Mehrere optische Teilerlemente bzw. Farbstrahlteiler sind im Detektionsstrahlengang angeordnet, wodurch sich ein ganz erheblicher apparativer Aufwand ergibt.

Hinsichtlich der Verwendung aktiver optischer Elemente im Strahlengang eines Laser-Scanning-Mikroskops wird ergänzend auf die US 4,827,125 und die US 5,410,371 verwiesen, wobei diese Druckschriften die grundsätzliche Verwendung eines AOD (Acousto-Optical-Deflector) und eines AOTF (Acousto-Optical-Tunable-Filter) zeigen, und zwar stets mit dem Zweck, einen Strahl abzulenken oder abzuschwächen.

Der vorliegenden Erfindung liegt nun die Aufgabe zugrunde, eine optische Anordnung im Strahlengang einer zur Fluoreszenzanregung geeigneten Lichtquelle, vorzugsweise im Strahlengang eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops, derart auszugestalten und weiterzubilden, daß das Einkoppeln des Anregungslichts unterschiedlicher Anregungswellenlänge möglich ist, ohne bei einem Wechsel der Wellenlänge des Anregungslichts einen Wechsel oder eine besondere Justage der dort verwendeten optischen Elemente vornehmen zu müssen. Des weiteren soll die Anzahl der erforderlichen optischen Elemente weitestmöglich reduziert sein. Schließlich soll eine ideale Detektion des Fluoreszenzlichts möglich sein.

Die erfindungsgemäße optische Anordnung im Strahlengang einer zur Fluoreszenzanregung geeigneten Lichtquelle, vorzugsweise im Strahlengang eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops, löst die voranstehende Aufgabe durch die Merkmale der nebengeordneten Patentansprüche 1 und 2. Danach ist eine gattungsgemäße optische Anordnung dadurch gekennzeichnet, daß durch das spektral selektive Element Anregungslicht unterschiedlicher Wellenlängen ausblendbar sowie entsprechend einkoppelbar ist. Alternativ ist die optische Anordnung dadurch gekennzeichnet, daß das spektral selektive Element auf die auszublendende Anregungswellenlänge einstellbar ist.

Erfindungsgemäß ist erkannt worden, daß man im Strahlengang einer zur Fluoreszenzanregung geeigneten Lichtquelle, insbesondere im Strahlengang eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops, den dort bislang verwendeten Farbstrahlteiler durch ein ganz besonderes spektral selektives Element ersetzen kann, nämlich durch ein spektral selektives Element, welches geeignet ist, Anregungslicht unterschiedlicher Wellenlängen auszublenden oder einzublenden bzw. einzukoppeln. Dieses spektral selektive Element dient einerseits zum Einkoppeln des Anregungslichts mindestens einer Lichtquelle in das Mikroskop und andererseits zum Ausblenden des am Objekt gestreuten und reflektierten Anregungslichts bzw. der entsprechenden Anregungswellenlänge aus dem über den Detektionsstrahlengang vom Objekt kommenden Licht. Insoweit kommt dem spektral selek-

tiven Element eine Doppelfunktion zu, wobei beide Funktionen quasi zwangsgekoppelt sind.

Alternativ zu der Fähigkeit des spektral selektiven Elements, Anregungslicht unterschiedlicher Wellenlängen ausblenden zu können, ist das spektral selektive Element auf die jeweils einzublendende oder auszublendende Anregungswellenlänge einstellbar ist. Auch insoweit ist aufgrund der voranstehend geschilderten Doppelfunktion eine Zwangskopplung auf einfache Weise gewährleistet, nämlich dadurch, daß mit Hilfe des spektral selektiven Elements das Anregungslicht in den Beleuchtungsstrahlengang einkoppelbar und daß exakt die Wellenlänge des Anregungslichts, nämlich die Anregungswellenlänge, aufgrund der hier vorgesehenen Einstellbarkeit aus dem über den Detektionsstrahlengang vom Objekt kommenden Licht ausblendbar ist, so daß zur Detektion das vom Objekt kommende Detektionslicht (=Fluoreszenzlicht) verbleibt.

In vorteilhafter Weise kann es sich bei dem spektral selektiven Element – zur Begünstigung der voranstehend erörterten Doppelfunktion – um ein passives Element bzw. Bauteil handeln. Dazu könnte das spektral selektive Element als transparentes optisches Gitter oder als holographisches Element ausgeführt sein. Ebenso ist es denkbar, das spektral selektive Element als passiven AOD (Acousto-Optical-Deflector) oder als passiven AOTF (Acousto-Optical-Tunable-Filter) auszuführen.

In ganz besonders vorteilhafter Weise, nämlich zur konkreten Realisierung der Einstellbarkeit des spektral selektiven Elements auf die auszublendende Anregungswellenlänge, kann es sich bei dem spektral selektiven Element um ein aktives Bauteil handeln, so bspw. um ein akustooptisch und/oder elektrooptisch arbeitendes Element. Im Konkreten kommt hier als spektral selektives Element ein AOD (Acousto-Optical-Deflector) oder ein AOTF (Acousto-Optical-Tunable-Filter) in Frage.

Anstelle des im Stand der Technik üblichen Farbstrahlteilers wird hier ein aktives spektral selektives Element verwendet, so beispielsweise ein AOD oder ein AOTF. Die Aufgabe dieser aktiven Bauteile besteht darin, das Anregungslicht der Lichtquelle bzw. des Lasers oder der Laser $\lambda_{i11}, \lambda_{i12}, \lambda_{i13}, \dots, \lambda_{i1n}$ in den Beleuchtungsstrahlengang und somit in das Mikroskop einzukoppeln, um danach per Beam-Scanning die Fluoreszenzverteilung im Objekt anzuregen. Bei der Detektion kann das vom Objekt kommende Fluoreszenzlicht nahezu ungestört das aktive spektral selektive Element passieren. Dabei wird das vom Objekt gestreute oder reflektierte Licht mit den Anregungswellenlängen der Lichtquelle bzw. des Lasers oder der Laser aus dem Detektionsstrahlengang weitgehend herausreflektiert.

Zur Einkopplung einer Lichtquelle bzw. eines Lasers oder mehrerer Laser mit verschiedenen Wellenlängen $\lambda_{i11}, \lambda_{i12}, \dots, \lambda_{i1n}$ kann ein AOD mit entsprechenden Frequenzen v_1, v_2, \dots, v_n vorzugsweise simultan beschaltet werden, so daß die verschiedenen Laserstrahlen nach dem Durchgang durch den AOD koaxial mit der optischen Achse verlaufen. Hinsichtlich der Verwendung des AOD ist wesentlich, daß dort eine Frequenz v_n eine Wellenlänge λ_{i1n} selektiert, die aus dem eigentlichen Strahlengang abgelenkt wird. Der Ablenkwinkel Φ ist dabei durch die Formel

$$\Phi = \lambda_{i1n} v_n / 2f$$

definiert, wobei f die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Schallwelle im AOD ist. Das zu detektierende Fluoreszenzlicht mit einer spektralen Verteilung um die Wellenlängen $\lambda_{f11}, \lambda_{f12}, \dots, \lambda_{f1n}$ zusammen mit dem am Objekt gestreuten bzw. reflektierten Anregungslicht mit den Wellenlängen $\lambda_{i11}, \lambda_{i12}, \dots, \lambda_{i1n}$ durchläuft nun den AOD in umge-

kehrter Richtung. Jedoch wird gemäß der Umkehrbarkeit des Lichtwegs das Anregungslicht mit den Wellenlängen $\lambda_{i11}, \lambda_{i12}, \dots, \lambda_{i1n}$ wegen der spezifischen Einstellung des AOD aus dem Detektionsstrahlengang in Richtung des Lasers abgelenkt (1. Ordnung). Somit kann das "spektral verbleibende" Fluoreszenzlicht um die Wellenlängen $\lambda_{f11}, \lambda_{f12}, \dots, \lambda_{f1n}$ – verglichen mit einem herkömmlichen Farbstrahlteiler – auf verbesserte Weise detektiert werden (0. Ordnung). Dadurch läßt sich jedenfalls die Justage der Einkopplung unterschiedlicher Laser einfacher als im Stand der Technik (dort unter Anwendung herkömmlicher Farbstrahlteiler in einem Filtrerrad) vornehmen.

In weiter vorteilhafter Weise könnte ein Nachschalten weiterer AOTF die einzelnen Wellenlängen in ihrer Leistung nach der Strahlzusammenführung selektiv regeln.

Zur Einkopplung einer Laserlichtquelle mit verschiedenen Wellenlängen $\lambda_{f11}, \lambda_{f12}, \dots, \lambda_{f1n}$ kann ein AOTF mit entsprechenden Frequenzen v_1, v_2, \dots, v_n simultan geschaltet sein, so daß die verschiedenen Wellenlängen in ihrer Anregungsleistung variieren und auf die Anwendung hin optimierbar sind. Die Zuführung des Laserlichts kann mittels Lichtleitfaser erfolgen.

Jedenfalls wird die Lichtquelle bzw. der Laser koaxial aus der Richtung der 1. Ordnung des Kristalls eingekoppelt. Das zu detektierende Fluoreszenzlicht mit einer spektralen Verteilung um die Wellenlängen $\lambda_{f11}, \lambda_{f12}, \dots, \lambda_{f1n}$ gemeinsam mit dem am Objekt gestreuten bzw. reflektierten Anregungslicht mit den Wellenlängen $\lambda_{i11}, \lambda_{i12}, \dots, \lambda_{i1n}$ durchlaufen nun den AOTF in umgekehrte Richtung. Gemäß der Umkehrbarkeit des Lichtwegs wird das Anregungslicht mit den Wellenlängen $\lambda_{i11}, \lambda_{i12}, \dots, \lambda_{i1n}$ wegen der spezifischen Einstellung des AOTF aus dem Detektionsstrahlengang in Richtung der Lichtquelle bzw. des Lasers abgelenkt. Somit kann auch hierbei das "spektral verbleibende" Fluoreszenzlicht um die Wellenlängen $\lambda_{f11}, \lambda_{f12}, \dots, \lambda_{f1n}$ in einer – verglichen zum herkömmlichen Farbstrahlteiler – verbesserten Weise detektiert werden (0. Ordnung).

Sowohl unter Verwendung eines AOD oder AOTF als auch unter Verwendung eines transparenten Gitters wird sich das Fluoreszenzlicht nach dem Durchgang durch das jeweilige aktive Element aufgrund der auftretenden Dispersion spektral auffächern. Insoweit ist es von Vorteil, ein oder mehrere entsprechende "inversell Elemente nachzuschalten, so daß die ungewünschte spektrale Auffächerung wieder rückgängig gemacht wird. Auch ist es denkbar, weitere optische Elemente zur Fokussierung oder zum Ausblenden unerwünschter Strahlanteile dem jeweiligen Element (AOD, AOTF oder transparentes Gitter) vor- bzw. nachzuschalten. Der dadurch wiedervereinigte Detektionsstrahl kann dann in herkömmlicher Weise durch nachgeschaltete Farbstrahlteiler spektral zerlegt und auf die verschiedenen Detektoren abgebildet werden.

Grundsätzlich ist eine Anordnung im Sinne eines "Multibanddetektor" denkbar. Hierzu wird auf die Patentanmeldung DE 43 30 347.1-42 verwiesen, deren Inhalt hier ausdrücklich hinzugezogen und insoweit als bekannt vorausgesetzt wird. Zwischen der Scan-Einheit und dem AOD bzw. dem transparenten Gitter (bei mehreren Lichtquellen bzw. Lasern mehrerer Wellenlängen) bzw. dem AOTF (bei einer Lichtquelle bzw. einem Laser mit verschiedenen Wellenlängen) ist das Anregungs-Pinhole angeordnet, wobei dieses identisch mit dem Detektions-Pinhole ist. In vorteilhafter Weise wird dabei die Eigenschaft des Kristalls, den Lichtstrahl der 0. Ordnung durch den Prismeneffekt spektral aufzufächern, zur Detektion genutzt. Das dispersive Element des Multibanddetektors ist dabei mit dem Farbstrahlteiler zu einem Bauteil vereinigt, wodurch alle weiteren, dem herkömmlichen Detektionsstrahlengang nachgeordneten und

mit weiteren Verlusten in der Fluoreszenzintensität behafteten Farbstrahlteiler entfallen.

In ganz besonders vorteilhafter Weise kann die voranstehend erörterte Technik in Kombination mit einer in der Wellenlänge variabel durchstimmbaren Laserlichtquelle – z. B. Farbstofflaser, OPO (optisch parametrisierter Oszillator), Elektronenstrahlkollisionslichtquelle – äußerst flexible Fluoreszenzmikroskopie-Anwendungen ermöglichen. Die Einstellung bzw. Kontrolle der Anregungswellenlänge kann direkt mit der Ansteuereinheit eines der zuvor beschriebenen spektral selektiven Elemente gekoppelt sein, so daß nur diese Anregungswellenlänge koaxial in den Anregungsstrahlengang des Mikroskops eingekoppelt und wiederum nur diese Wellenlänge aus dem Detektionsstrahlengang ausgeblendet wird. Die Kopplung bzw. Zwangskopplung der Lichtquelle mit dem strahlteilenden Element kann entweder manuell oder automatisch oder gar nach einer vorgebbaren Vorschrift erfolgen, wobei diese Möglichkeit dem jeweiligen Anforderungsprofil anzupassen ist. Beispielsweise kann nach jeder gescannten Bildebene die Anregungswellenlänge sowie der Strahlteiler in geeigneter Weise verändert werden. Somit lassen sich Mehrfarbenfluoreszenzobjekte detektieren. Eine zeilenweise Umschaltung ist ebenso denkbar.

Zusammenfassend lassen sich die Vorteile der erfindungsgemäßen Lehre nebst vorteilhafter Ausgestaltung wie folgt zusammenfassen:

Die spektral selektiven Elemente sind für alle Wellenlängen außer für die selektierten Anregungswellenlängen $\lambda_{\text{ill1}}, \lambda_{\text{ill2}}, \dots, \lambda_{\text{illn}}$ "transparent". Der "spektrale Verlust" ist minimal, da vom spektral selektiven Element nur der selektierte spektrale Bereich von typischerweise $\lambda_{\text{illn}} \pm 2 \text{ nm}$ abgelenkt wird. Dadurch wird der spektrale Bereich für die Detektion vergrößert. Somit können nahezu beliebig viele unterschiedliche Wellenlängenbereiche simultan eingekoppelt und genutzt werden. Die spektral "verlorene Fluoreszenzintensität", die durch die spektral selektiven Elemente bedingt ist, ist geringer als bei herkömmlichen Farbstrahlteilern. Mit anderen Worten liegen hier reduzierte Intensitätsverluste im interessierenden Bereich vor. Die aktiven spektral selektiven Elemente sind flexibel einstellbar, so daß prinzipiell beliebig viele Lichtquellen bzw. Laser mit unterschiedlichen Wellenlängen auch simultan in das Mikroskop eingekoppelt sind. Dies ermöglicht die verbesserte Anwendung bei Multi-Color FISH (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung). Folglich ist dann nur noch eine Limitierung der spektralen Aufspaltung des Fluoreszenzlichts, bspw. durch "Cross-Talk", gegeben. Herkömmliche Sperrfilter können komplett entfallen, so daß weitere Verluste von Fluoreszenzlicht in der Detektion vermieden sind.

Schließlich ist es auch denkbar, daß ein anderes aktives holographisches Element dem spektral selektiven Element nachgeschaltet ist und dabei die Aufgabe des Strahlscanners ausübt. Beide Elemente können zu einem einzigen Bauteil zusammengefaßt sein.

Grundsätzlich lassen sich unterschiedliche Lichtquellen verwenden, solange sie zur Fluoreszenzanregung geeignet sind. So kommt bspw. eine Weißlichtquelle, eine Lichtquelle zur Verwendung eines optisch parametrisierten Oszillators, eine Elektronenstrahlkollisionslichtquelle oder eine Laserlichtquelle in Frage, wobei die Laserlichtquelle in der Wellenlänge variabel durchstimmbar sein kann. Laserlichtquellen mit verschiedenen Wellenlängen oder eine mehrere Laser umfassende Lichtquelle ist bzw. sind verwendbar.

Es gibt nun verschiedene Möglichkeiten, die Lehre der vorliegenden Erfindung in vorteilhafter Weise auszugestalten und weiterzubilden. Dazu ist einerseits auf die den Patentansprüchen 1 und 2 nachgeordneten Patentansprüche, andererseits auf die nachfolgende Erläuterung bevorzugter

Ausführungsbeispiele der Erfindung anhand der Zeichnung zu verweisen. In Verbindung mit der Erläuterung der bevorzugten Ausführungsbeispiele der Erfindung anhand der Zeichnung werden auch im allgemeinen bevorzugte Ausgestaltungen und Weiterbildungen der Lehre erläutert. In der Zeichnung zeigen

Fig. 1 in einer schematischen Darstellung eine gattungsbildende optische Anordnung im Strahlengang eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops zur Dokumentation des der Erfindung zugrundeliegenden Standes der Technik,

Fig. 2 in einer schematischen Darstellung ein erstes Ausführungsbeispiel einer erfindungsgemäßen optischen Anordnung im Strahlengang eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops, wobei dort ein Laser mit unterschiedlichen Anregungswellenlängen einkoppelbar ist,

Fig. 3 in einer schematischen Darstellung ein zweites Ausführungsbeispiel einer erfindungsgemäßen optischen Anordnung im Strahlengang eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops, wobei dort drei Laser mit unterschiedlichen Anregungswellenlängen einkoppelbar sind,

Fig. 4 in einer schematischen Darstellung ein drittes Ausführungsbeispiel einer erfindungsgemäßen optischen Anordnung im Strahlengang eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops, wobei dort die Einkopplung von drei Laserlichtquellen über ein transparentes Gitter erfolgt,

Fig. 5 in schematischer Darstellung, vergrößert und teilweise, den Beleuchtungsstrahlengang und Detektionsstrahlengang, wobei dem aktiven spektral selektiven Element zur Strahlzusammenführung dienende Mittel nachgeschaltet sind,

Fig. 6 in schematischer Darstellung, vergrößert und teilweise, den Beleuchtungsstrahlengang und Detektionsstrahlengang, wobei dort eine Dispersionskorrektur erfolgt,

Fig. 7 in einer schematischen Darstellung die prinzipielle Funktionsweise eines AOD oder AOTF,

Fig. 8 in einer schematischen Darstellung ein weiteres Ausführungsbeispiel einer erfindungsgemäßen optischen Anordnung, wobei dort eine zusätzliche spektrale Auffächerung vor einem Multibanddetektor stattfindet und

Fig. 9 in einer schematischen Darstellung das Ausführungsbeispiel aus **Fig. 8**, wobei dort im Detektionsstrahlengang vor dem Multibanddetektor ein variables Spaltfilter angeordnet ist.

Fig. 1 dokumentiert den Stand der Technik und zeigt dabei eine herkömmliche optische Anordnung im Strahlengang einer zur Fluoreszenzanregung geeigneten Lichtquelle, wobei es sich hier um eine optische Anordnung im Strahlengang eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops handelt. Der Laserscanner **1** ist dabei lediglich symbolisch dargestellt. Bei der den Stand der Technik betreffenden Darstellung sind als Lichtquellen insgesamt drei Laser **2** vorgesehen, die mit ihrem Anregungslicht **3** über spektral selektive Elemente **4** in den Beleuchtungsstrahlengang **5** des Mikroskops einkoppeln. Bei den spektral selektiven Elementen **4** handelt es sich im Konkreten um einen Spiegel **6** sowie um Farbstrahlteiler **7**. Jedenfalls wird das Anregungslicht **3** in den Beleuchtungsstrahlengang **5** eingekoppelt und gelangt über einen weiteren Spiegel **8** als Anregungslicht **9** zum Laserscanner **1**.

Das von dem ebenfalls lediglich symbolisch dargestellten Objekt **10** zurückkommende Licht – hier handelt es sich um das am Objekt gestreute und reflektierte Anregungslicht **9** einerseits und um das vom Objekt **10** ausgesandte Fluoreszenzlicht **11** – gelangt über den Spiegel **8** zu dem spektral selektiven Element **4**, wobei es sich hier um den Farbstrahlteiler **7** handelt. Von dort aus wird das Anregungslicht **9** bzw. die Anregungswellenlänge aus dem über den Detektionsstrahlengang **12** vom Objekt **10** kommenden Licht **13** ausge-

blendet und gelangt als zurückkommendes Anregungslicht **9** zurück zu den Lasern **2**. Das durch den Farbstrahlteiler **7** nicht abgelenkte Detektionslicht **14** gelangt unmittelbar zu dem Detektor **15**.

Erfindungsgemäß ist durch das spektral selektive Element **4** zurückkommendes Anregungslicht **3** unterschiedlicher Wellenlängen ausblendbar. Dies ist insbesondere in **Fig. 4** dargestellt.

Alternativ – in ebenfalls erfindungsgemäßer Weise – ist das spektral selektive Element **4** auf die auszublendende Anregungswellenlänge einstellbar. Dies läßt sich den Ausführungsbeispielen aus den **Fig. 2, 3** und **8, 9** besonders gut entnehmen.

Bei dem in **Fig. 2** gezeigten Ausführungsbeispiel ist lediglich ein Laser **2** vorgesehen, dessen Anregungslicht **3** unterschiedliche Wellenlängen aufweisen kann. Jedenfalls gelangt das Anregungslicht **3** über einen Spiegel **6** und über ein zusätzliches optisches Element, nämlich über eine Linse **16** zu einem AOTF **17**, der als spektral selektives Element arbeitet. Von dort aus gelangt das Anregungslicht **3** wiederum über ein zusätzliches optisches Element – im hier gewählten Ausführungsbeispiel eine Linse **18** – und über einen Spiegel **8** zum Laserscanner **1**. Vom Objekt **10** reflektiert, gelangt das zurückkommende Licht – reflektiertes Anregungslicht **9** und Detektionslicht **11** – über den Spiegel **8** und die Linse **18** zurück in den AOTF **17** und wird dort entsprechend der Beschaltung des AOTF **17** teilweise ausgeblendet. Im Konkreten wird nämlich das Detektionslicht bzw. Fluoreszenzlicht **11** über den Detektionsstrahlengang **12** zum Detektor **15** geführt (0. Ordnung). Das zurückkommende Anregungslicht **9** wird dagegen über die Linse **16** und den Spiegel **6** zurück zum Laser **2** geführt und ist somit aus dem Detektionsstrahlengang **12** ausgeblendet.

Ähnlich verhält es sich bei dem in **Fig. 3** gezeigten Ausführungsbeispiel, wobei dort gleichzeitig drei Laser **2** über zusätzliche optische Elemente, hier Linsen **16**, ihr Anregungslicht **3** über ein AOD **19**, eine weitere nachgeschaltete Linse **18** und einen Spiegel **8** in den Beleuchtungsstrahlengang **5** ein koppeln. Von dort aus gelangt das Anregungslicht **3** zum Laserscanner **1** und zum Objekt **10**.

Das vom Objekt kommende Licht **13** umfaßt bei dem voranstehend genannten Ausführungsbeispiel Fluoreszenzlicht **11** und zurückkommendes Anregungslicht **9**, wobei dort der AOD **19** das zurückkommende Fluoreszenzlicht als Detektionslicht **14** zu dem Detektor **15** führt. Das zurückkommende Anregungslicht **9** wird ausgeblendet und gelangt über Linsen **16** zu den jeweiligen Lasern **2**.

Das in **Fig. 4** gezeigte Ausführungsbeispiel umfaßt als spektral selektives Element **4** ein transparentes Gitter **20**, wobei über das transparente Gitter **20** gleichzeitig drei Laser **2** ihr Anregungslicht **3** in den Beleuchtungsstrahlengang **5** des Mikroskops einkoppeln. Wesentlich ist hier jedenfalls, daß das transparente Gitter **20** das vom Objekt **10** zurückkommende Anregungslicht **9** aus dem Detektionsstrahlengang ausblendet, so daß dieses Licht zurück zu den Lasern **2** gelangt. Das zu detektierende Fluoreszenzlicht **11** gelangt über den Detektionsstrahlengang **12** zum Detektor **15**.

Fig. 5 zeigt die Möglichkeit einer Dispersionskorrektur, wobei das vom Objekt zurückkommende Licht **13** in den AOTF **17** oder AOD **19** gelangt. Dort wird das zurückkommende Detektionslicht **14** – zwangsweise – spektral aufgefächert und über nachgeschaltete Elemente – AOD/AOTF – parallelisiert und schließlich konvergiert. Das spektral vereinigte Detektionslicht **14** gelangt von dort zu dem in **Fig. 5** nicht gezeigten Detektor **15**.

Bei der in **Fig. 6** gezeigten Dispersionskorrektur wird das vom Objekt kommende Licht **13** mittels AOD **17/AOTF 19** aufgefächert, wobei das aufgefächerte Detektionslicht **14**

über ein weiteres passives spektral selektives Element **4** – AOTF **17** oder AOD **19** – über eine Linse **21** mit Feldkorrektur konvertiert und durch ein Detektionsspinhole **22** oder durch einen Detektionsspalt zum Detektor **15** gelangt.

Gemäß der Darstellung in **Fig. 7** handelt es sich bei dem spektral selektiven Element **4** um ein AOTF **17** oder ein AOD **19**, wobei diese Elemente einen speziellen Kristall mit dispersionsfreier 0. Ordnung umfassen. Dieser Kristall bzw. dieses spektral selektive Element wird über ein Piezoelement **23** angeregt bzw. beaufschlagt. **Fig. 7** zeigt besonders deutlich, daß das vom Objekt kommende Licht **13** in dem AOTF **17** bzw. AOD **19** aufgespalten wird, wobei das Detektionslicht **14** als dispersionsfreies Licht 0. Ordnung ungehindert durch den Kristall läuft. Das vom Objekt zurückkommende Anregungslicht **9** wird dagegen als Licht 1. Ordnung abgelenkt und zurück zu den hier nicht gezeigten Lasern geführt.

Fig. 8 zeigt eine spezielle Detektion unter Ausnutzung der spektralen Auffächerung des spektral selektiven Elements **4**, wobei hier im Konkreten ein AOTF **17** verwendet ist. Das vom Objekt **10** kommende Licht **13** wird im AOTF **17** spektral aufgespalten, wobei das Detektionslicht **14** über eine Linse **16** und einen Spiegel **6** zu einem Multibanddetektor **24** bzw. Spektrometer gelangt. Der Spiegel **6** führt zu einer Verlängerung der Strecke, so daß eine Auffächerung des zurückkommenden Detektionslichts **14** bis hin zum Multibanddetektor **24** begünstigt wird.

Das im AOTF **17** ausgeblendete Anregungslicht **9** gelangt über die Linse **16** und den Spiegel **8** zurück zum Laser **2**.

Schließlich zeigt **Fig. 9** in einer schematischen Darstellung das Ausführungsbeispiel aus **Fig. 8**, wobei dort – in Ergänzung – im Detektionsstrahlengang vor dem Multibanddetektor **24** ein variables Spaltfilter **25** angeordnet ist. Dieses Spaltfilter **25** ist im Detektionsstrahlengang **12** unmittelbar vor dem Detektor **15** angeordnet und im Detektionsstrahlengang positionierbar. Desweiteren ist der Spalt **26** des Spaltfilters **25** variabel, so daß auch insoweit eine spektrale Selektion des Detektionslichts **14** möglich ist.

Hinsichtlich weiterer Ausgestaltungen der erfindungsgemäßen Lehre, die den Figuren nicht zu entnehmen sind, wird zur Vermeidung von Wiederholungen auf den allgemeinen Teil der Beschreibung und die dort geschilderte Funktionsweise der Lehre und der vorteilhaften Ausgestaltungen verwiesen.

Bezugszeichenliste

- 1** Laserscanner
- 2** Laser (Lichtquelle)
- 3** Anregungslicht
- 4** spektral selektives Element
- 5** Beleuchtungsstrahlengang
- 6** Spiegel
- 7** Farbstrahlteiler
- 8** Spiegel
- 9** Anregungs- und Detektionslicht
- 10** Objekt
- 11** Fluoreszenzlicht (Detektionslicht)
- 12** Detektionsstrahlengang
- 13** (vom Objekt kommendes) Licht
- 14** Detektionslicht (nicht abgelenktes Detektionslicht)
- 15** Detektor
- 16** Linse
- 17** AOTF
- 18** Linse
- 19** AOD
- 20** transparentes Gitter
- 21** Linse (mit Feldkorrektur)

22 Detektions-Pinhole
 23 Piezoelement
 24 Multibanddetektor (Spektrometer)
 25 (variables) Spaltfilter
 26 Spalt (von 25)

Patentansprüche

1. Optische Anordnung im Strahlengang einer zur Fluoreszenzanregung geeigneten Lichtquelle, vorzugsweise im Strahlengang eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops, mit mindestens einem spektral selektiven Element (4) zum Einkoppeln des Anregungslichts (3) mindestens einer Lichtquelle (2) in das Mikroskop und zum Ausblenden des am Objekt (10) gestreuten und reflektierten Anregungslichts (3) bzw. der Anregungswellenlänge aus dem über den Detektionsstrahlengang (12) vom Objekt (10) kommenden Licht (13), **dadurch gekennzeichnet**, daß durch das spektral selektive Element (4) Anregungslicht (3, 9) unterschiedlicher Wellenlängen ausblendbar ist.
2. Optische Anordnung im Strahlengang einer zur Fluoreszenzanregung geeigneten Lichtquelle, vorzugsweise im Strahlengang eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops, mit mindestens einem spektral selektiven Element (4) zum Einkoppeln des Anregungslichts (3) mindestens einer Lichtquelle (2) in das Mikroskop und zum Ausblenden des am Objekt (10) gestreuten und reflektierten Anregungslichts (3) bzw. der Anregungswellenlänge aus dem über den Detektionsstrahlengang (12) vom Objekt (10) kommenden Licht (13), **dadurch gekennzeichnet**, daß das spektral selektive Element (4) auf die auszublendende Anregungswellenlänge einstellbar ist.
3. Optische Anordnung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß es sich bei dem spektral selektiven Element (4) um ein passives Bauteil handelt.
4. Optische Anordnung nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß das spektral selektive Element (4) als transparentes optisches Gitter (20) ausgeführt ist.
5. Optische Anordnung nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß das spektral selektive Element (4) als holographisches Element ausgeführt ist.
6. Optische Anordnung nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß das spektral selektive Element (4) als passives AOD (Acousto-Optical-Deflector) (19) oder passives AOTF (Acousto-Optical-Tunable-Filter) (17) ausgeführt ist.
7. Optische Anordnung nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß es sich bei dem spektral selektiven Element (4) um ein aktives Bauteil handelt.
8. Optische Anordnung nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß das spektral selektive Element (4) akustooptisch und/oder elektrooptisch arbeitet.
9. Optische Anordnung nach Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß das spektral selektive Element (4) als AOD (Acousto-Optical-Deflector) (19) ausgeführt ist.
10. Optische Anordnung nach Anspruch 9, wobei mehrere Lichtquellen mit unterschiedlichen Wellenlängen einkoppelbar sind, **dadurch gekennzeichnet**, daß das AOD (19) mit entsprechenden Frequenzen vorzugsweise simultan beschaltbar ist, so daß die verschiedenen Lichtstrahlen nach dem Durchgang des AOD (19) koaxial mit der optischen Achse des Beleuchtungsstrahlengangs (5) sind.
11. Optische Anordnung nach Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß das spektral selektive Element (4)

als AOTF (Acousto-Optical-Tunable-Filter) (17) ausgeführt ist.

12. Optische Anordnung nach Anspruch 11, wobei eine Lichtquelle mit unterschiedlichen Wellenlängen einkoppelbar ist, **dadurch gekennzeichnet**, daß das AOTF (17) mit entsprechenden Frequenzen simultan beschaltbar ist.

13. Optische Anordnung nach einem der Ansprüche 7 bis 12, **dadurch gekennzeichnet**, daß das spektral selektive Element (4) derart konstruiert ist, daß eine spektrale Auffächerung des Detektionslichts (11) zumindest weitgehend vermieden ist.

14. Optische Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 13, **dadurch gekennzeichnet**, daß zur leistungsspezifischen Regelung einzelner Wellenlängen dem spektral selektiven Element (4) mindestens ein weiteres aktives bzw. spektral selektives Element nachgeschaltet ist.

15. Optische Anordnung nach Anspruch 14, **dadurch gekennzeichnet**, daß es sich bei dem weiteren spektral selektiven Element um ein AOD (19) handelt.

16. Optische Anordnung nach Anspruch 14, **dadurch gekennzeichnet**, daß es sich bei dem weiteren spektral selektiven Element um ein AOTF (17) handelt.

17. Optische Anordnung nach einem der Ansprüche 7 bis 16, wobei das spektral selektive Element (4) eine Ansteuereinheit umfaßt, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Einstellung/Kontrolle der Anregungswellenlänge mit der Ansteuereinheit zwangsgekoppelt ist, so daß nur diese Anregungswellenlänge vorzugsweise koaxial in den Beleuchtungsstrahlengang (5) des Mikroskops einkoppelbar ist und ausschließlich diese Wellenlänge aus dem Detektionsstrahlengang (12) ausblendbar ist.

18. Optische Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 17, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Ansteuerung der Lichtquelle (2) mit dem spektral selektiven Element (4) manuell oder automatisch erfolgt.

19. Optische Anordnung nach Anspruch 18, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Ansteuerung der Lichtquelle (2) mit dem spektral selektiven Element (4) nach einer frei definierbaren Vorschrift erfolgt.

20. Optische Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 19, **dadurch gekennzeichnet**, daß dem spektral selektiven Element (4) mindestens ein weiteres optisches Element vor- und/oder nachgeschaltet ist.

21. Optische Anordnung nach Anspruch 20, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein im Beleuchtungsstrahlengang (5) dem spektral selektiven Element (4) nachgeschaltetes aktives holographisches Element als Strahlscanner dient.

22. Optische Anordnung nach Anspruch 21, **dadurch gekennzeichnet**, daß das spektral selektive Element (4) und das nachgeschaltete holographische Element zu einem funktionalen Baustein vereint sind.

23. Optische Anordnung nach Anspruch 20, **dadurch gekennzeichnet**, daß es sich bei dem weiteren optischen Element um ein Strahlanpassungsmittel bzw. um ein Mittel zur Kompensation der durch das spektral selektive Element (4) verursachten spektralen Auffächerung handelt.

24. Optische Anordnung nach Anspruch 23, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Strahlanpassungsmittel als Linse (16) ausgeführt ist.

25. Optische Anordnung nach Anspruch 23, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Strahlanpassungsmittel als Prisma ausgeführt ist.

26. Optische Anordnung nach Anspruch 23, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Strahlanpassungsmittel als

Blende, vorzugsweise als Lochblende oder Schlitzblende, ausgeführt ist.

27. Optische Anordnung nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß das Strahlanpassungsmittel als Filter, vorzugsweise als Sperrfilter, ausgeführt ist. 5

28. Optische Anordnung nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß das Filter unmittelbar vor dem Detektor (15) angeordnet ist.

29. Optische Anordnung nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß das Strahlanpassungsmittel als Fokussiermittel ausgeführt ist. 10

30. Optische Anordnung nach einem der Ansprüche 20 bis 29, dadurch gekennzeichnet, daß als weiteres optisches Element ein Farbstrahlteiler zur weiteren spektralen Zerlegung vorgesehen ist. 15

31. Optische Anordnung nach einem der Ansprüche 20 bis 30, dadurch gekennzeichnet, daß als weiteres optisches Element mindestens ein AOTF (17) vorgesehen ist.

32. Optische Anordnung nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, daß das AOTF (17) als passives Element verwendbar ist.

33. Optische Anordnung nach einem der Ansprüche 20 bis 32, dadurch gekennzeichnet, daß Kombinationen weiterer optischer Elemente vorgesehen sind. 25

34. Optische Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 33, dadurch gekennzeichnet, daß im Detektionsstrahlengang (12) Mittel zur Mehrfachreflexion angeordnet sind, die eine Winkelvergrößerung der Auffächerung des Detektionsstrahls herbeiführen. 30

35. Optische Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 34, dadurch gekennzeichnet, daß im Detektionsstrahlengang (12), vorzugsweise unmittelbar vor dem Detektor (15), ein Spaltfilter (25) angeordnet ist.

36. Optische Anordnung nach Anspruch 35, dadurch gekennzeichnet, daß das Spaltfilter (25) im Detektionsstrahlengang (12) positionierbar ist. 35

37. Optische Anordnung nach Anspruch 35 oder 36, dadurch gekennzeichnet, daß der Spalt (26) des Spaltfilters (25) variabel ist. 40

38. Optische Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 37, dadurch gekennzeichnet, daß im Detektionsstrahlengang (12) nach dem spektral selektiven Element (4) ein Spektrometer zur Detektion der spektralen Auffächerung angeordnet ist. 45

39. Optische Anordnung nach Anspruch 37, dadurch gekennzeichnet, daß der Spektrometer als Multiband-detektor (24) ausgeführt ist.

40. Optische Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 39, dadurch gekennzeichnet, daß die ausgeblendeten Anregungswellenlängen in Richtung der Lichtquellen (2) aus dem Detektionsstrahlengang (12) abgelenkt werden. 50

41. Optische Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 40, dadurch gekennzeichnet, daß die Lichtquelle (2) als Weißlichtquelle ausgeführt ist. 55

42. Optische Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 40, dadurch gekennzeichnet, daß die Lichtquelle (2) als optisch parametrisierter Oszillator (OPO) ausgeführt ist. 60

43. Optische Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 40, dadurch gekennzeichnet, daß die Lichtquelle (2) als Elektronenstrahlkollisionslichtquelle ausgeführt ist.

44. Optische Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 40, dadurch gekennzeichnet, daß die Lichtquelle (2) als Laserlichtquelle ausgeführt ist. 65

45. Optische Anordnung nach Anspruch 44, dadurch gekennzeichnet, daß die Laserlichtquelle in der Wel-

lenlänge variabel durchstimmbar ist.

46. Optische Anordnung nach Anspruch 44 oder 45, dadurch gekennzeichnet, daß die Laserlichtquelle einen Laser mit verschiedenen Wellenlängen umfaßt.

47. Optische Anordnung nach Anspruch 44, dadurch gekennzeichnet, daß die Lichtquelle mehrere Laser (2) mit unterschiedlichen Wellenlängen umfaßt.

48. Optische Anordnung nach einem der Ansprüche 44 bis 47, dadurch gekennzeichnet, daß der Laser (2) als Farbstofflaser ausgeführt ist.

Hierzu 8 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

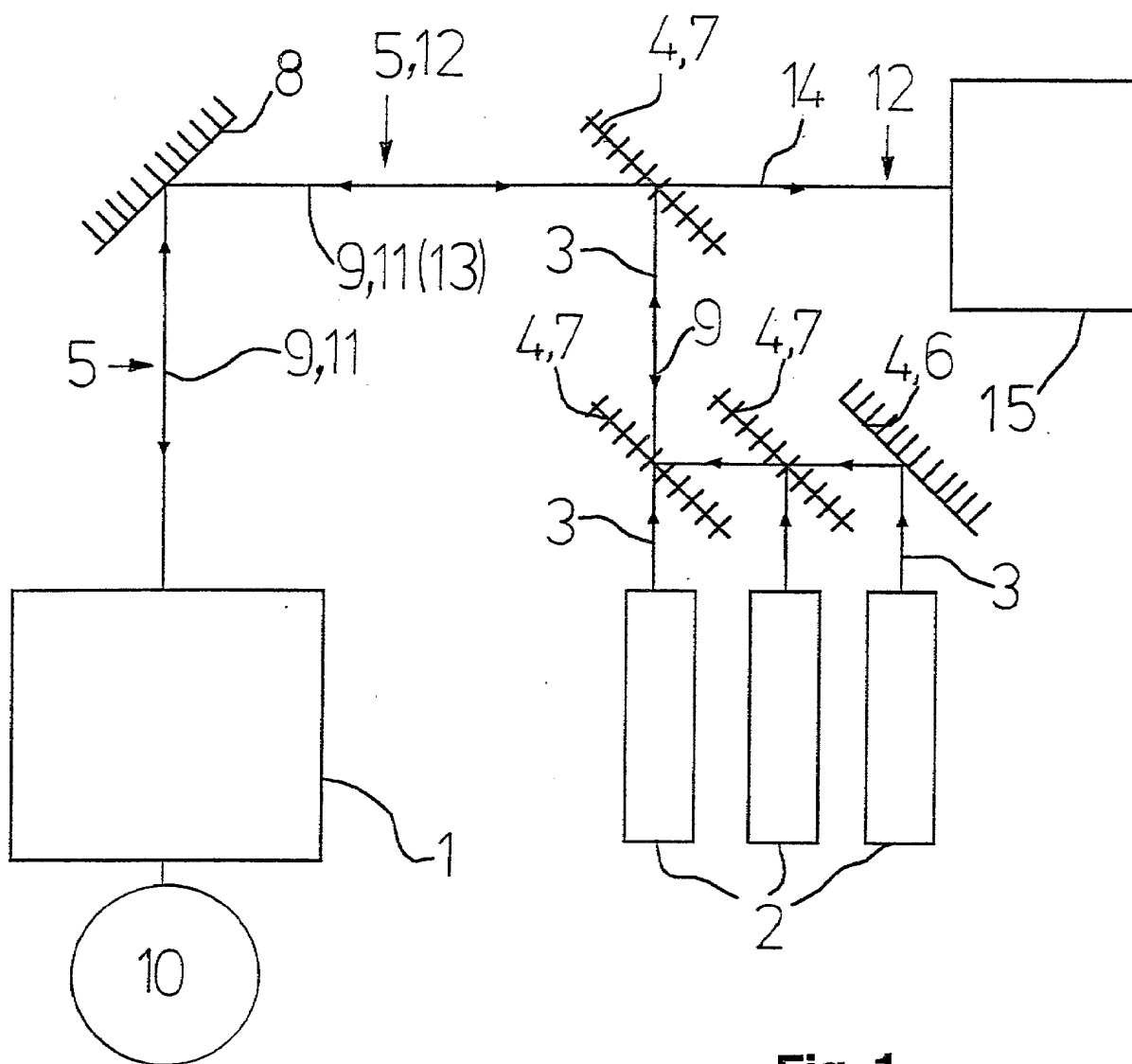


Fig. 1

Stand der Technik

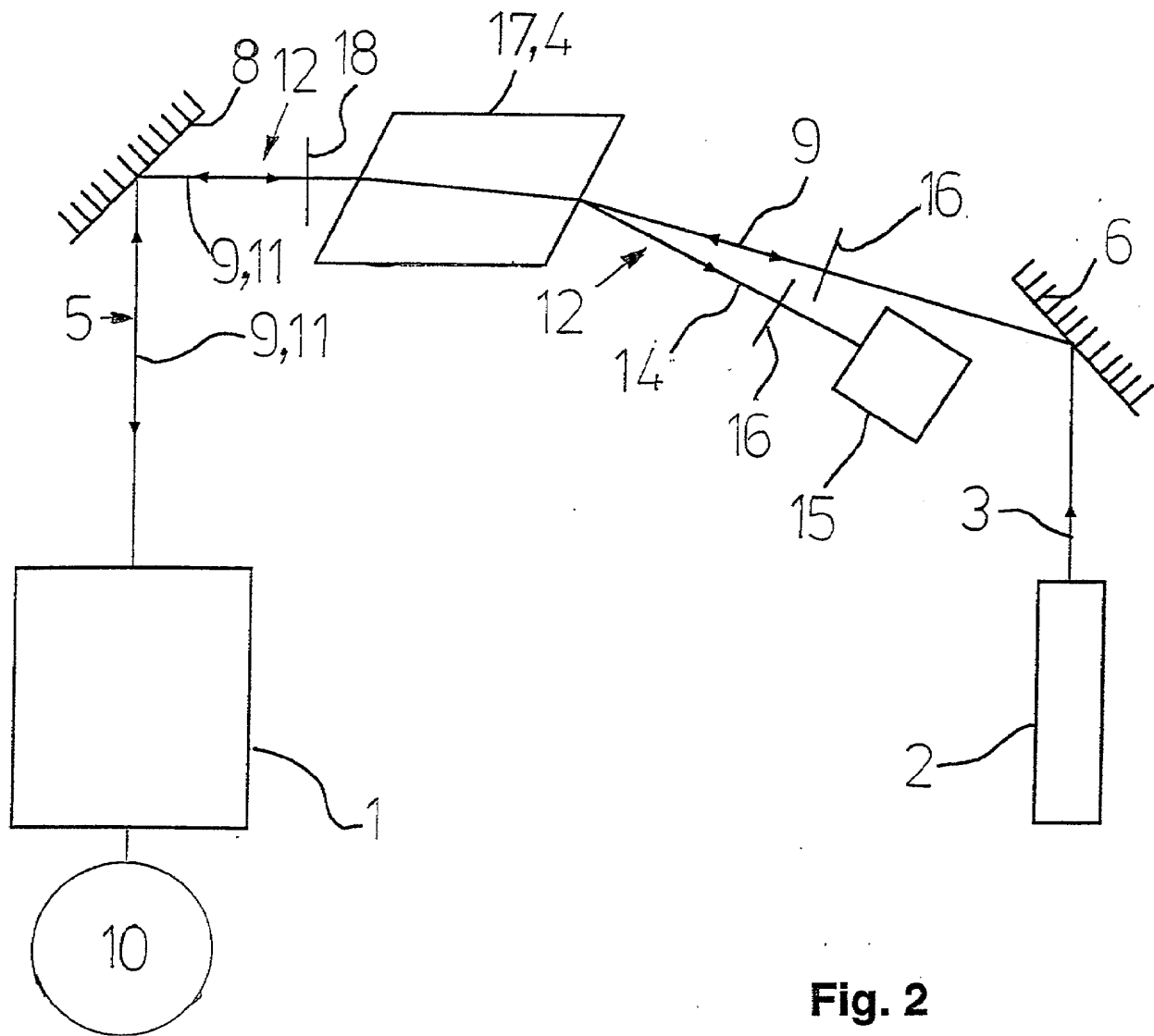


Fig. 2

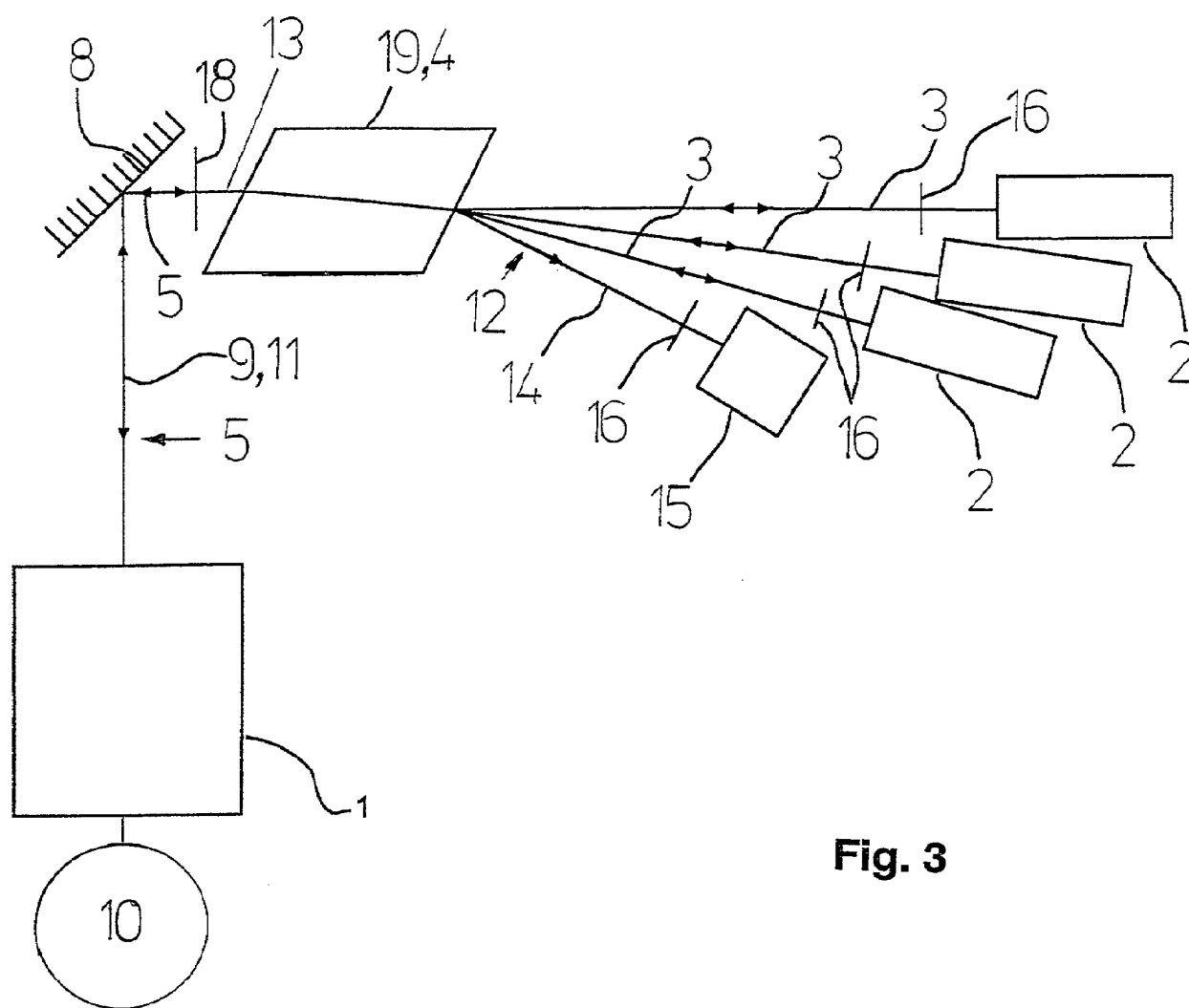


Fig. 3

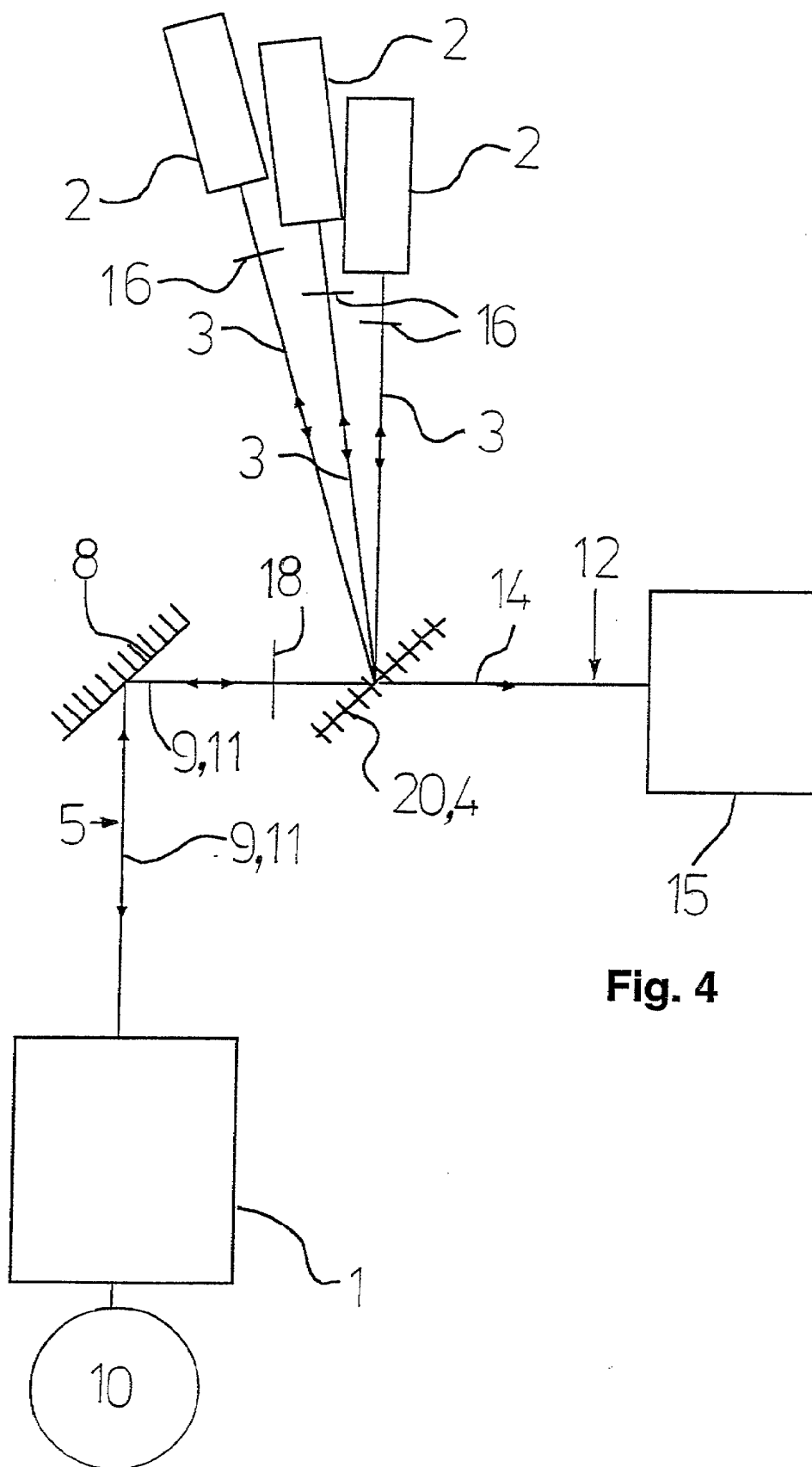


Fig. 4

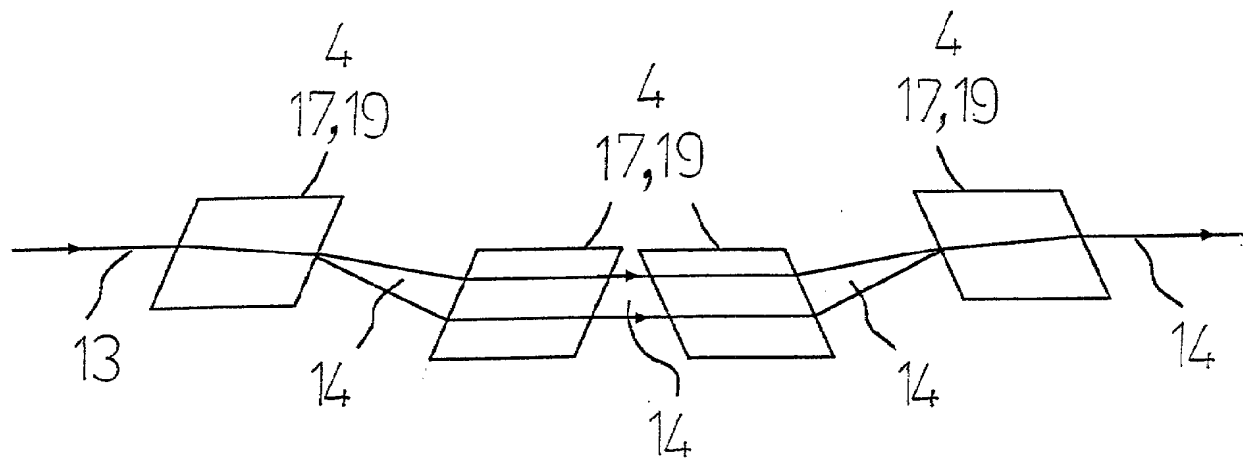


Fig. 5

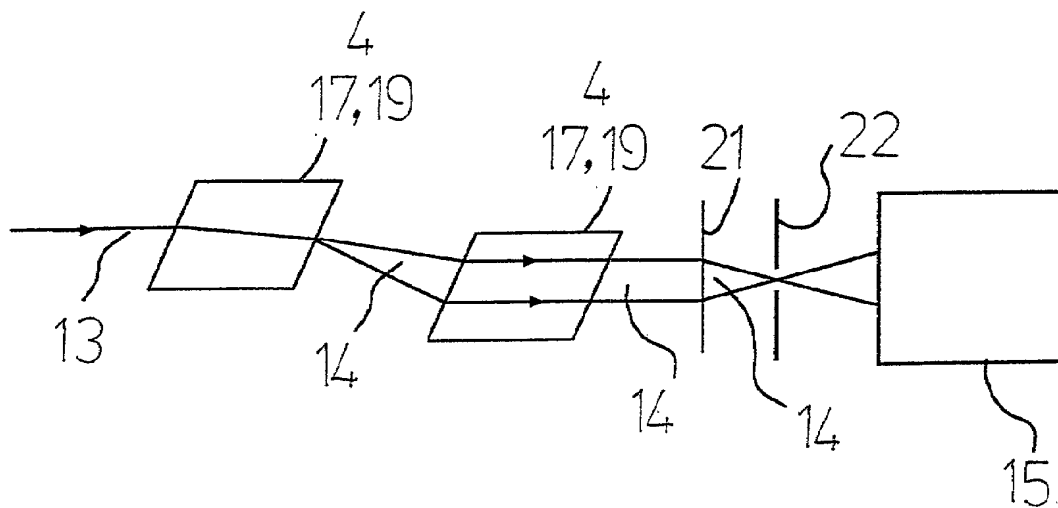


Fig. 6

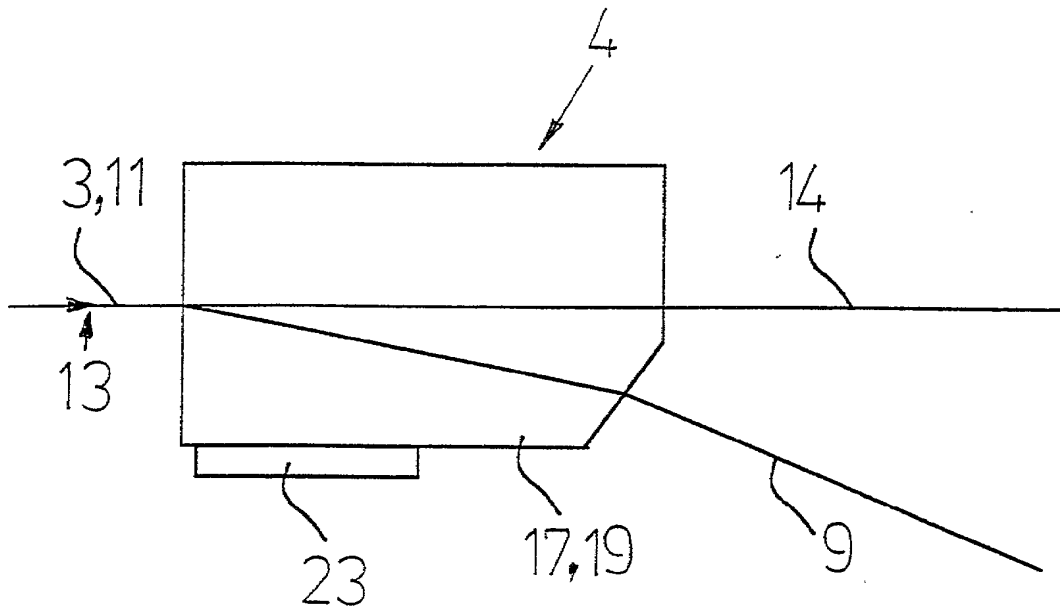


Fig. 7

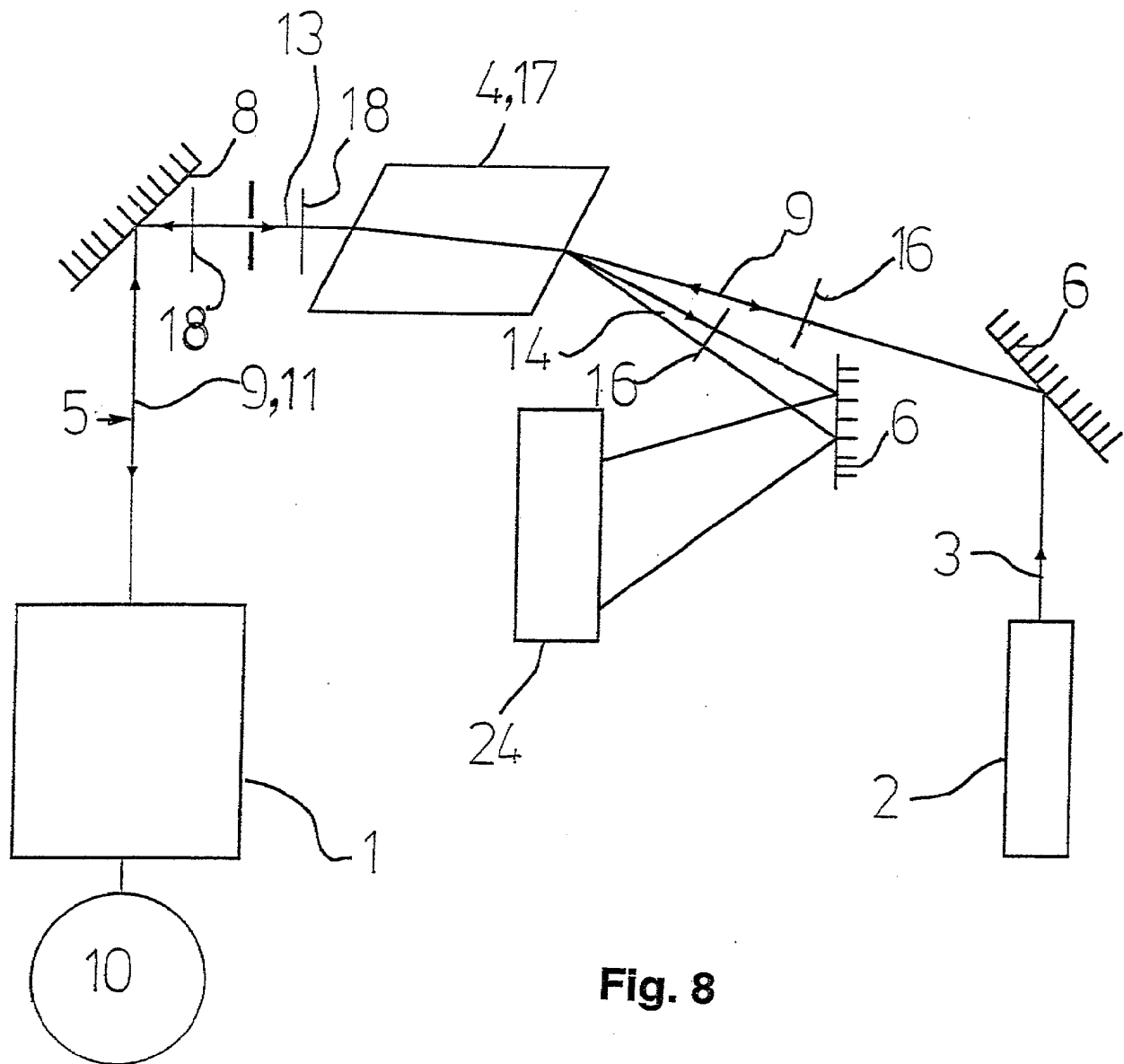


Fig. 8

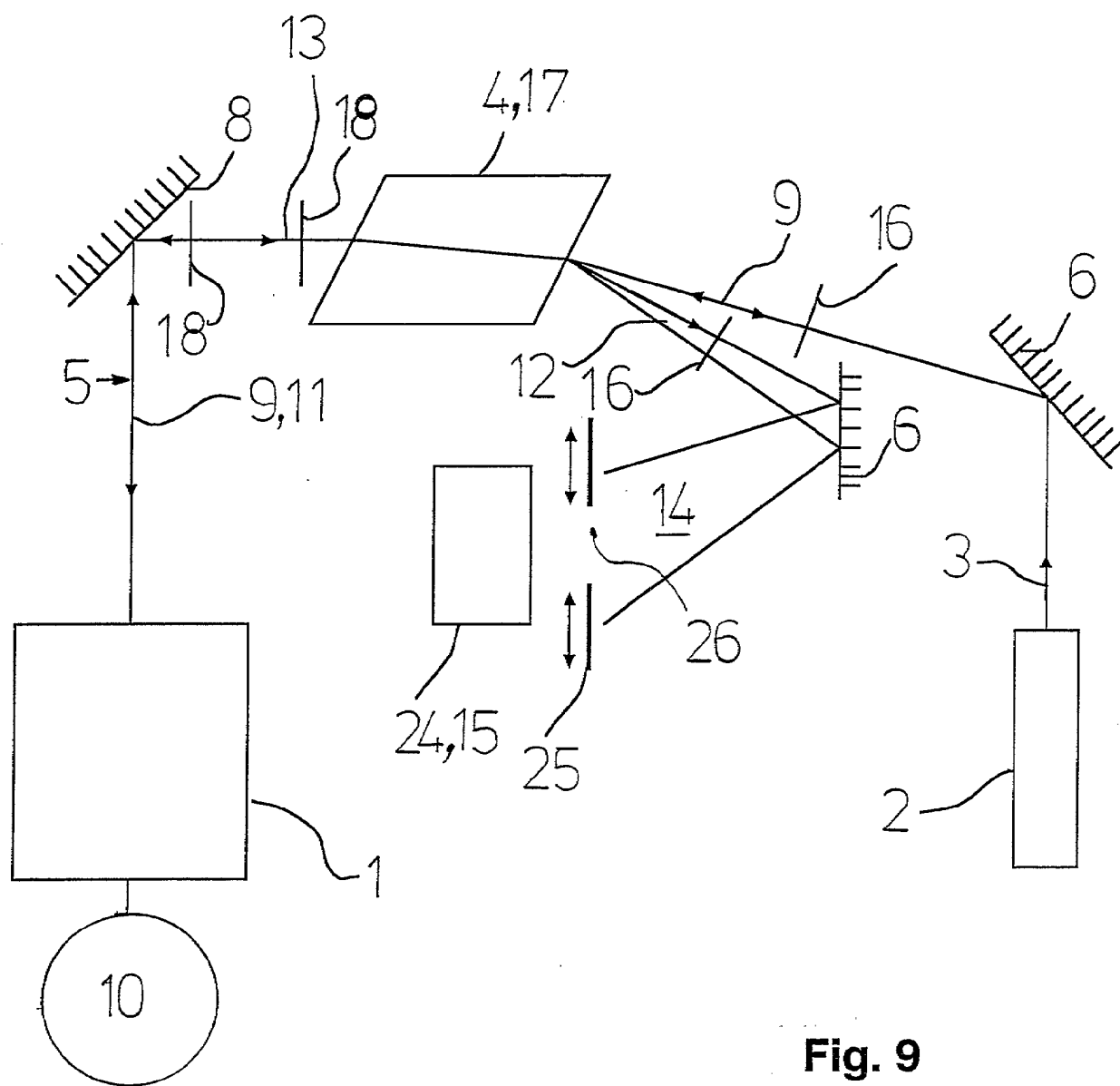


Fig. 9